



①9 BUNDESREPUBLIK  
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES  
PATENTAMT

⑫ **Offenlegungsschrift**  
⑩ **DE 42 24 737 A 1**

⑤1 Int. Cl.<sup>5</sup>:  
**C 07 H 19/073**  
A 61 K 31/70

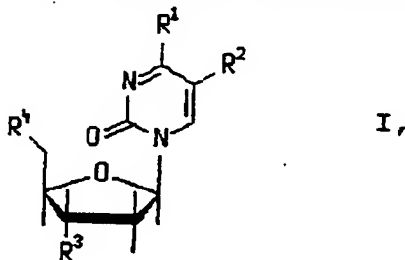
②1 Aktenzeichen: P 42 24 737.3  
②2 Anmeldetag: 27. 7. 92  
④3 Offenlegungstag: 3. 2. 94

DE 42 24 737 A 1

⑦1 Anmelder:  
Schott, Herbert, Prof. Dr., 7400 Tübingen, DE

⑦2 Erfinder:  
Schott, Herbert, Prof. Dr., 7400 Tübingen, DE;  
Schwendener, Reto Albert, Dr., Kilchberg, CH;  
Guérin, Frederique Odile, Dr., 6606  
Saarbrücken-Gersweiler, DE

- ⑤4 Neue Cytosinnucleosidanaloga, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung  
⑤7 Es werden neue Cytosinnucleosidanaloga der Formel I



worin  
R<sup>1</sup> eine acylierte oder alkylierte Aminogruppe  
R<sup>2</sup> Wasserstoff, Fluor-, Chlor-, Brom-, Jodatome oder ein Alkylrest,  
R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup>, die aus der Gruppe, bestehend aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Azido, Hydroxyl, Phosphat ausgewählt sind, bedeuten, sowie deren Herstellung beschrieben. Die Verbindungen eignen sich direkt oder in Form von Immunoliposomen zur Therapie von Krebserkrankungen und virusbedingten Infektionen.

DE 42 24 737 A 1

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

BUNDESDRUCKEREI 12. 93 308 065/64

9/92

Die vorliegende Erfindung betrifft neue Cytosinnucleosidanaloga, deren Herstellung sowie deren Verwendung bei der Behandlung von Krebserkrankungen und virusbedingten Infektionen. Cytosinnucleosidanaloga, die bestimmte Strukturmerkmale aufweisen, sind bewährte Arzneimittel in der Chemotherapie von Tumoren und von virusbedingten Infektionskrankheiten (AIDS Res. Human Retroviruses 8, 119 (1992)). Die therapeutische Wirkung von Cytosinnucleosidanaloga ist dadurch limitiert, daß körpereigene Cytosindesaminasen die Aminogruppe der Nucleobase zu schnell desaminieren, und die dabei gebildeten Uracilnucleosidanaloga in der Regel therapeutisch unwirksam sind (Biochem. Pharmacol. 33, 2159 (1984)). Zur Erzielung einer therapeutischen Wirkung müssen Cytosinnucleosidanaloga daher in hohen Dosen appliziert werden, die für den Patienten mit schwerwiegenden Nebenwirkungen verbunden sind. Um die zu schnelle enzymatische Desaminierung zeitlich zu verzögern, wurde die Aminogruppe des Zytostatikums araC beispielsweise mit N<sup>4</sup>-Acyl- (Int. J. Cancer 37, 149 (1986)) und mit N<sup>4</sup>-Alkylschutzgruppen (Int. J. Cancer, 51, 466 (1992)) maskiert. Inwieweit ein solcher Schutz der Aminogruppe, der sich bei araC bewährt hat, auch bei anderen therapeutisch wirksamen Cytosinnucleosidanaloga die therapeutische Wirkung verbessert, ist unbekannt.

Aufgabe dieser Erfindung ist es, neue Cytosinnucleosidanaloga zu synthetisieren, mit denen Krebserkrankungen und virusbedingte Infektionen noch wirksamer bekämpft werden können.

Die Aufgabe wurde dadurch gelöst, daß im Rahmen dieser Erfindung eine neue Klasse von Cytosinnucleosidanaloga synthetisiert wurden, deren N<sup>4</sup>-Aminogruppe mit lipophilen Schutzgruppen maskiert ist, so daß die erfindungsgemäßen Verbindungen effektiver gegen eine enzymatische Desaminierung geschützt sind. Die Einführung der lipophilen Reste in die hydrophilen, therapeutisch wirksamen Cytosinnucleosidanaloga führt zu Prodrugs mit stark veränderten pharmakokinetischem Verhalten. Durch die Veränderung des pharmakokinetischen Verhaltens kann überraschenderweise die zu applizierende Dosis im Vergleich zu den ungeschützten Cytosinnucleosidanaloga erhöht werden, ohne daß es gleichzeitig zu einer Verstärkung aller toxischen Nebeneffekte dieser hochpotenten Medikamente führt. Weiterhin ermöglicht die langsame Umsetzung des Prodrugs in den pharmakologisch aktiven Wirkstoff eine vorteilhafte Intervalltherapie. Mit diesen Cytosinnucleosidanaloga und/oder in Zusammensetzung mit einem biologisch verträglichen Träger und/oder mit Mitteln, die die erfindungsgemäßen Verbindungen mindestens in einer oder mehreren der Zusammensetzungen enthalten, kann die Therapie von Krebserkrankungen und virusbedingten Infektionskrankheiten optimiert werden.

Für eine möglichst wirksame Applikation der erfindungsgemäßen Verbindungen werden weiterhin Zusammensetzungen verschiedener Art bereitgestellt. Allen diesen Zusammensetzungen ist gemeinsam, daß die erfindungsgemäßen Verbindungen in Verbindung mit einem organischen Träger stehen. Die Bindung an den organischen Träger kann eine auf lipophilen Wechselwirkungen beruhende Assoziation sein.

Als organische Träger sind pharmakologisch unwirksame Oligo- und/oder Polynucleotide denkbar.

Eine besonders bevorzugte Ausführungsform der Zu-

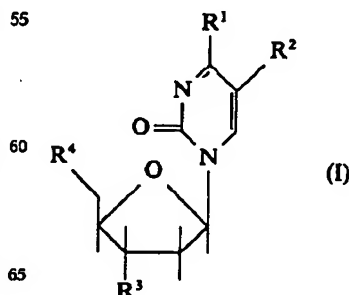
sammensetzung sieht die Assoziation der erfindungsgemäßen Verbindungen in Form von Liposomen vor. Der feste Einbau in die Lipidmembran bei lipophilen Wirkstoffen verleiht diesen ein gänzlich verändertes pharmakokinetisches und -dynamisches Verhalten im Organismus. Eine bevorzugte Ausführungsform sieht die Bereitstellung einer Zusammensetzung aus den erfindungsgemäßen Verbindungen und uni- bis oligolamellaren Liposomen mit einem Durchmesser von maximal 0,4 µm vor. Die erfindungsgemäßen Verbindungen werden dabei in die Lipiddoppelschicht der Liposomen integriert.

Eine weitere Möglichkeit, die erfindungsgemäßen Verbindungen mit einem organischen Träger zu verbinden, ist der Einschluß der Verbindungen in ein biologisch verträgliches Nanopartikel. Als Nanopartikel werden organisch-chemische Polymere bezeichnet, denen bei der Polymerisation die erfindungsgemäßen Verbindungen zugesetzt werden, so daß sie mit einer gewissen Effizienz in das Nanopartikel eingeschlossen werden.

Die Zusammensetzung wird in einer bevorzugten Ausführungsform mit Komponenten ausgeführt, die sich in den zu therapierenden Zellen und/oder Organen spezifisch anreichern. Dabei kann beispielsweise die Zusammensetzung der Liposomen so gewählt werden, daß die Liposomen zusätzlich mit Molekülen wie z. B. Antikörper, geladene Lipide, mit hydrophilen Kopfgruppen modifizierte Lipide versehen werden, damit die Zusammensetzung sich bevorzugt in den zu therapierenden Zellen und/oder Organen anreichert. Eine solche Zusammensetzung mit spezifisch gegen virusinfizierte Zellen und/oder Organe gerichteten Molekülen erhöht die therapeutische Wirkung der Arzneimittel und reduziert gleichzeitig die Toxizität für nichtinfiziertes Gewebe.

Die Zusammensetzungen können zu einem Mittel verarbeitet werden, das neben den erfindungsgemäßen Verbindungen und gegebenenfalls dem organischen Träger weiterhin übliche Träger- und/oder Verdünnungsmittel und/oder Hilfsstoffe enthält. Übliche Trägermittel sind beispielsweise Glucose, Dextrose, Albumine oder ähnliches, während als Verdünnungsmittel im wesentlichen physiologische Kochsalzlösungen oder eine 5%ige Glucoselösung dient. Weiterhin ist es üblich, die Lösungen mit geeigneten Reagenzien, beispielsweise Phosphaten, abzupuffern. Darüberhinaus können alle weiteren, für die Zubereitung von pharmazeutischen Mitteln üblichen Mittel hinzugesetzt werden, vorausgesetzt, sie greifen die Zusammensetzung aus dem organischen Träger und den erfindungsgemäßen Verbindungen nicht an. Das Mittel kann beispielsweise als Infusionslösung verabreicht werden.

Gegenstand der Erfindung sind Cytosinnucleosidanaloga der Formel I



worin

R<sup>1</sup> eine acylierte oder alkylierte Aminogruppe, deren Acyl- oder Alkylrest 8 bis 24 C-Atome und 0 bis 2 Doppelbindungen aufweisen, linear oder verzweigt sind, und R<sup>2</sup> Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Jodatome oder ein linear oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 24 C-Atomen und 0 bis 2 Doppelbindungen, und R<sup>3</sup> und R<sup>4</sup>, die gleich oder verschieden sein können und aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Azido, Hydroxyl, Phosphat ausgewählt sind, bedeuten.

Ist R<sup>1</sup> eine alkylierte Aminogruppe, so kommen als Alkylreste Hexadecyl und Octadecyl vorzugsweise in Betracht.

Ist R<sup>1</sup> eine acylierte Aminogruppe, so sind folgende Acylreste bevorzugt: Palmitoyl, Oleoyl, Stearyl und Behenoyl (Decasanoyl).

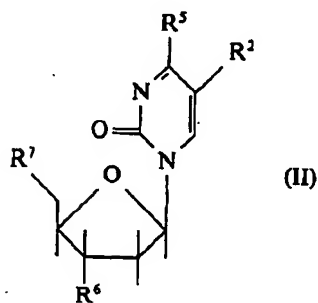
Für R<sup>2</sup> sind Wasserstoff, Fluor, Methyl-, Ethyl- und langkettige Alkylreste bevorzugt.

Für R<sup>3</sup> sind Wasserstoff oder eine Azidogruppe bevorzugt.

Für R<sup>4</sup> sind eine Hydroxylgruppe oder Phosphatgruppe bevorzugt.

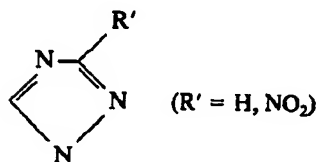
Die neuen Cytosinnucleosidanaloga der Formel I lassen sich herstellen, indem man

#### a) Verbindungen der Formel II



worin

R<sup>2</sup> die angegebene Bedeutung hat, und R<sup>6</sup>, R<sup>7</sup>, die gleich oder verschieden sein können und aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Azido, Acetyl, Phosphat ausgewählt sind, und R<sup>5</sup> ein Chloratom oder den Rest



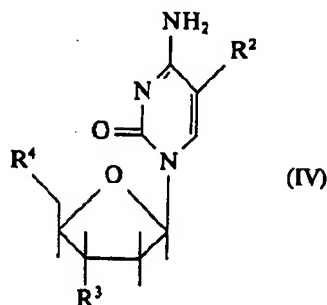
bedeuten, mit einem Amin der Formel III

HNR'' (III).

worin,

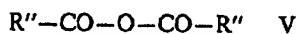
R'' einen C<sub>8</sub>-C<sub>24</sub> Alkylrest, der gegebenenfalls 0 bis 2 Doppelbindungen aufweisen, linear oder verzweigt sein kann, bedeutet, umgesetzt und in den so erhaltenen Verbindungen gegebenenfalls die Acetylgruppen gegen Wasserstoff austauscht oder indem man

#### b) eine Verbindung der Formel IV



worin

R<sup>2</sup>, R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> die angegebene Bedeutung hat, mit einem Carbonsäureanhydrid der Formel V



worin

R'' die angegebene Bedeutung hat, umgesetzt.

Die Umsetzung a) gelingt gut in einem polaren Lösungsmittel wie Dioxan oder Methanol in der Siedehitze.

Der Austausch der Acetylreste gegen Wasserstoffatome kann wie folgt durchgeführt werden: Die Acetylreste werden durch Ammonolyse in wäbriger oder methanolischer Ammoniak durch Stehen bei 20 bis 60°C innerhalb von 2 bis 34 Stunden gegen Wasserstoffatome ausgetauscht.

Die Umsetzung b) gelingt besonders gut in Dioxan/Wasser in der Siedehitze.

Die für die Umsetzung benötigten Ausgangsmaterialien lassen sich in Analogie zu bekannten Verfahren herstellen oder sind bekannte Stoffe (Int. J. Cancer, 51, 466 (1992); Chem. Pharm. Bull. 26, 981 (1978)).

Die neuen Verbindungen zeichnen sich gegenüber den ungeschützten Cytosinnucleosidanaloga durch eine bessere Desaminaseresistenz aus. Weiter können durch die Anzahl, Länge, Art und Lage der jeweiligen Substituenten in den erfindungsgemäßen, Cytosinnucleosidanaloga die lipophilen Eigenschaften überraschenderweise in weiten Grenzen variiert werden.

Die lipophilen Nucleosidanaloga sind in Form von Liposomen dispergierbar. Zur Liposomenbildung können alle an sich bekannten Verfahren der Liposomenherstellung verwendet werden wie beispielsweise Ultraschall, Gelchromatographie, Detergenzdialyse. Die jeweils eingeführten lipophilen Reste beeinflussen maßgeblich die Größe und Stabilität der Liposomen, die sich aus den jeweiligen Cytosinnucleosidanaloga zusammen mit weiteren Lipidkomponenten bilden.

Durch die gezielte Einführung von lipophilen Resten lassen sich aber nicht nur die enzymatische Hydrolysebeständigkeit erhöhen und die Applikationsformen deutlich erweitern, sondern überraschenderweise auch zytostatische und virusstatische Wirkungen optimieren.

Die neuen Verbindungen lassen sich gegen maligne Erkrankungen der blutbildenden Zellen einsetzen, insbesondere gegen akute Leukämien und chronisch myeloische Leukämie im Blastenschub.

Es ist zu erwarten, daß durch die verbesserte zytostatische Wirkung vergleichsweise mit der Therapie mit 1-β-D-arabinofuranosylcytosin (araC), a) sehr viel weni-

ger gravierende Nebenwirkungen auftreten, b) höhere Dosen der zytostatisch wirksamen erfindungsgemäßen Verbindungen eingesetzt werden können und c) in zeitlichen Intervallen therapiert werden kann.

Die zytostatische Wirkung der lipophilen Cytosinnucleosidanaloga läßt sich in sogenannten Immunoliposomen überraschenderweise zur gezielten Zerstörung von bestimmten Tumorzellen nutzen. Hierzu werden die lipophilen Cytosinnucleosidanaloga zusammen mit weiteren funktionalisierten Lipidkomponenten in Form von Liposomen in physiologischen Puffersystemen dispergiert. An funktionellen Gruppen der Liposomenmembran werden monoklonale Antikörper immobilisiert. Die so erhaltenen Immunoliposomen werden in vitro bevorzugt von den Tumorzellen aufgenommen, die das dem Antikörper entsprechende Antigen exprimieren. Die Folge dieses Zelltargetings ist die selektive Zerstörung der jeweiligen Zieltumorzelle in einem Gemisch verschiedener Zellen.

Die Wirkung der neuen Verbindungen läßt sich in folgender Versuchsanordnung zeigen:

DBA/2-Mäusen wurden L1210 Tumorzellen intravenös injiziert, wodurch eine Leukämie simuliert wurde. Am Tag 3 und 7 nach der Tumorzell-Injektion wurden den tumortragenden Tieren verschiedene Dosierungen der Testsubstanz oder Lösungsmittel verabreicht. Insgesamt ergab sich folgende Einteilung in die einzelnen Versuchsgruppen:

- Kontrollgruppe (Lösungsmittel)
- i.v. Applikation (2 Dosierungen)
- i.p. Applikation (2 Dosierungen)
- i.v. AraC als Referenz (2 Dosierungen)
- i.p. AraC als Referenz (2 Dosierungen).

Als Parameter für den Therapieerfolg wird die mediane Überlebenszeit der einzelnen Versuchsgruppen (10 Tiere pro Gruppe) berechnet. In diesen Versuchen zeigten die neuen Verbindungen eine bessere Wirkung als das bewährte Zytostatikum araC.

Überraschenderweise zeigen die erfindungsgemäßen lipophilen Cytosinnucleosidanaloga auch virustatische Wirkungen, so daß sie in der Chemotherapie von virusbedingten Infektionen wie beispielsweise der AIDS Erkrankung verwendbar sind.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

#### Beispiel 1

Darstellung von  
N<sup>4</sup>-Hexadecyl-5-methyl-3'-azido-2',3'-didesoxycytidin  
(im folgenden mit hxd<sup>4</sup>m<sup>5</sup>AzddCyd abgekürzt)

a) Darstellung der Ausgangsverbindung  
4-(1,2,4-Triazol-1-yl)-5-methyl-1-(β-D-3'-azido-5'-O-acetyl-2',3'-didesoxyribofuranosyl-2(1H)-pyrimidinon

13.4 g (50 mmol) käufliches 2'-Azido-2',3'-didesoxythymidin (AZT) werden in 100 ml wasserfreiem Pyridin mit 23.5 ml (250 mmol) Essigsäureanhydrid 5 h bei Raumtemperatur gerührt, dann mit 20 ml Methanol versetzt und erneut 15 min. gerührt. Die Lösung wird am Rotationsverdampfer zu Sirup konzentriert, der zur Entfernung von Pyridin mit Toluol abrotiert wird. Der Rückstand wird in 160 ml wasserfreiem Acetonitril aufgenommen und dann zu der, im folgenden beschriebenen Reaktionslösung zugetropft.

31.1 g (450 mmol) 1,2,4-Triazol werden in 260 ml was-

serfreiem Acetonitril suspendiert, mit 8.8 ml (96 mmol) Phosphorylchlorid versetzt und im Eisbad auf ca. 4°C gekühlt. Unter kräftigem Rühren läßt man in das gekühlte Reaktionsgemisch innerhalb von 1 h 60 ml (431 mmol) Triethylamin und anschließend die obige Lösung des AZT-Derivats innerhalb von 1 h zutropfen. Dann wird das Eisbad entfernt und das Reaktionsgemisch weitere 45 min. gerührt. Der Niederschlag wird abgenußt, zweimal mit je 50 ml Acetonitril gewaschen und verworfen. Das Filtrat wird mit 45 ml Triethylamin und 12 ml Wasser versetzt, nach 10 min. im Vacuum auf ca. 50 ml konzentriert und dann mit 600 ml Chloroform, 500 ml 2%iger wäßrige Natriumhydrogencarbonatlösung aufgeschüttelt. Die wäßrige Phase wird zweimal mit je 100 ml Chloroform extrahiert, die vereinigten Chloroformphasen werden am Rotationsverdampfer zum Sirup konzentriert, der mit ca. 300 ml Ethanol in der Wärme gelöst wird. Beim Erkalten kristallisiert das gewünschte Produkt aus und wird nochmals aus 150 ml Ethanol umkristallisiert. Nach dem Trocknen im Vacuum werden 14.7 mg (41 mmol) weiße Kristalle (Fp. 143–144°C) erhalten.

#### b) Herstellung des Endproduktes

Zu dem Syntheseprodukt aus a), das in 120 ml Dioxan gelöst ist, werden innerhalb von 1 h 13.5 g (55 mmol) Hexadecylamin, gelöst in 120 ml Ethanol, bei Raumtemperatur zugetropft. Der Reaktionsansatz wird 1.5 h gerührt, dann im Vacuum zum Sirup konzentriert und in 500 ml Methanol aufgenommen, die mit Ammoniak bei Raumtemperatur gesättigt wurden. Der gut verschlossene Reaktionsansatz wird nach 12 h Stehen bei Raumtemperatur im Vacuum zum Sirup konzentriert, der anschließend an einer Kieselgelsäule mit Chloroform/Methanol-Gradienten chromatographisch gereinigt wird. Die Fraktionen des gewünschten Produkts werden im Vacuum vom Lösungsmittel befreit. Hierbei erhält man 16.0 g N<sup>4</sup>-Hexadecyl-5-methyl-3'-azido-2',3'-didesoxycytidin als Sirup, das auf der Kieselgelplatte im System Chloroform/Methanol; 9/1; V/V einen R<sub>F</sub>-Wert von 0.52 aufweist. In der FD-Massenspektroskopie wird für den Molekülpeak + H der Wert 491.1 gefunden und somit die berechnete Molekülmasse von 490,7 bestätigt.

#### Beispiel 2

Darstellung von N<sup>4</sup>-Palmitoyl-2',3'-didesoxycytidin

Zu 36.2 g (73.2 mmol) Palmitinsäureanhydrid, gelöst in 500 ml Dioxan, werden 8.0 g 2',3'-Didesoxycytidin, gelöst in 45 ml Wasser, gegeben. Man erhitzt das Reaktionsgemisch 1 h unter Rückfluß, entfernt dann das Lösungsmittel am Rotationsverdampfer und extrahiert den festen Rückstand 20 h mit n-Hexan in einer Soxhlet-apparatur. Der getrocknete Extraktionsrückstand ergibt 18.2 g N<sup>4</sup>-Palmitoyl-2',3'-didesoxycytidin als weißes Pulver, das auf der Kieselgelplatte in Chloroform/Methanol (80/20; V/V) einen R<sub>F</sub>-Wert von 0,45 aufweist.

#### Beispiel 3

Herstellung einer Zusammensetzung, enthaltend einen organischen Träger, eine der erfindungsgemäßen Cytosinnucleosidanaloga, Cholesterol und ein Antioxidans.

## 1. Zusammensetzung der Liposomen

Liposomen mit 10 mg der erfindungsgemäßen Verbindung ( $\text{hxd}^4\text{m}^5\text{AzddCyd}$ ) pro ml.

100 ml Liposomen enthalten: 4.0 g Phosphatidylcholin, 0.4 g Cholesterol, 0.02 g  $\alpha$ -DL-Tocopherol, 1.0 g  $\text{hxd}^4\text{m}^5\text{AzddCyd}$  dispergiert in 0.9% Kochsalzlösung, die, wenn nötig, zum Beispiel mit Phosphatpuffer auf einen gewünschten pH-Wert eingestellt ist. Anstelle der gegebenenfalls gepufferten Kochsalzlösung kann auch ein 67 mM physiologischer Phosphatpuffer oder eine 5%ige Glucoselösung verwendet werden.

## 2. Herstellung

Herstellung von 100 ml Liposomendispersion, die 10 mg der erfindungsgemäßen Verbindung  $\text{hxd}^4\text{m}^5\text{AzddCyd}$  pro ml enthalten.

Die Lipide (4.0 g Phosphatidylcholin, 0.4 g Cholesterol, 0.02 g  $\alpha$ -DL-Tocopherol und 1.0 g der erfindungsgemäßen Verbindung  $\text{hxd}^4\text{m}^5\text{AzddCyd}$  werden mit einer geeigneten Menge Methylenchlorid/Methanol; 1/1; V/V (100 bis 500 ml) in einem 500 ml Rundkolben gelöst. Die organischen Lösungsmittel werden bei 40°C in einem Rotationsverdampfer entfernt. Die entstandene, lösungsmittelfreie Lipid/ $\text{hxd}^4\text{m}^5\text{AzddCyd}$  Mischung wird durch Zugabe einer entsprechenden Menge von 0.9% Kochsalzlösung, die zum Beispiel mit 10 mM Phosphatpuffer abgepuffert sein kann, in 100 ml solubilisiert. Anstelle der gegebenenfalls gepufferten Kochsalzlösung kann auch ein 67 mM physiologischer Phosphatpuffer oder eine 5%ige Glucoselösung verwendet werden.

Die entstehenden, sogenannten multilamellaren Liposomen können mit einem geeigneten Verfahren, z. B. Ultraschallung, Hochdruckfiltration, Detergentsdialyse, Mikroemulgation oder anderen geeigneten Methoden, weiterverarbeitet werden.

## Beispiel 4

## Darstellung der Liposomenpräparate durch Ultraschall

Für die Herstellung von Liposomendispersionen werden pro ml Chloroform/Methanol; 1/1; V/V jeweils 100 mg Soja-Phosphatidylcholin, 10 mg Cholesterol, 1 mg  $\alpha$ -DL-Tocopherol, 7 mg  $\text{N}^2$ -Palmitoyl- $\text{N}^6$ -succinoyl-L-lysin und 2 bis 12 mg des erfindungsgemäßen lipophilen Cytosinnucleosidanaloga gelöst.

0.6 bis 2.4 ml dieser Lipidstammmlösung werden in einem Reagenzglas durch Verblasen mit Luft in einen Lipidfilm überführt, der anschließend ca. 1 h bei 50°C im Vakuum getrocknet wird. Der Lipidfilm wird mit 3 ml 10 mM PBS (0.9% NaCl und 10 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$ , pH 7.3) versetzt und mit Hilfe einer Mikrospritze eines Desintegrators 30 min mit 40 Watt beschallt. Hierbei bildet sich eine opaleszente Liposomendispersion.

## Beispiel 5

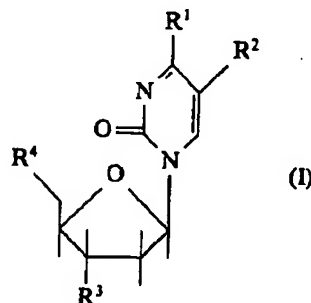
## Darstellung der Immunoliposomen

1.2 nmol eines Antikörpers werden als Lyophilisat mit 50  $\mu\text{l}$  des Liposomenpräparats aus Beispiel 4 und 7 mg (27  $\mu\text{mol}$ )  $\text{N}(3\text{-Dimethylaminopropyl})\text{-N}'\text{-ethyl-carbodiimid X HCL}$  (EDC) versetzt und durch Zugabe von 30  $\mu\text{l}$  PBS (pH 1) auf pH 4 eingestellt. Im einstündigen Abstand werden noch zweimal jeweils 7 mg EDC zugegeben. Nach ca. 5 h Rühren bei Raumtemperatur wird

der Reaktionsansatz auf eine Ultragel ACA 22-Säule aufgetragen und mit PBS (pH 7.4) fraktioniert. Fraktionen deren Absorptionsverhältnisse mit den Werten des eingesetzten Liposomenpräparats übereinstimmen, werden vereinigt und zum Zelltargeting verwendet.

## Patentansprüche

## 1. Cytosinnucleosidanaloga der Formel I



worin

$\text{R}^1$  eine acylierte oder alkylierte Aminogruppe, deren Acyl- oder Alkylrest 8 bis 24 C-Atome und 0 bis 2 Doppelbindungen aufweisen, linear oder verzweigt sind, und

$\text{R}^2$  Wasserstoff-, Fluor-, Chlor-, Brom-, Jodatome oder ein linear oder verzweigter Alkylrest mit 1 bis 24 C-Atomen und 0 bis 2 Doppelbindungen, und  $\text{R}^3, \text{R}^4$ , die gleich oder verschieden sein können und aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Fluor, Chlor, Brom, Jod, Azido, Hydroxyl, Phosphat ausgewählt sind, bedeuten.

2. Cytosinnucleosidanaloga gemäß Anspruch 1, worin

$\text{R}^1$  eine acylierte Aminogruppe ist, deren Acylrest aus der Gruppe Palmitoyl, Oleoyl, Stearyl und Behenoyl ausgewählt ist.

3. Cytosinnucleosidanaloga gemäß Anspruch 1, worin

$\text{R}^1$  eine alkylierte Aminogruppe ist, deren Alkylrest Hexadecyl oder Octadecyl ist.

4. Cytosinnucleosidanaloga gemäß Anspruch 2 oder 3 worin

$\text{R}^2, \text{R}^3$  Wasserstoff, und

$\text{R}^4$  Hydroxyl oder Phosphat bedeuten.

5. Cytosinnucleosidanaloga gemäß Anspruch 2 oder 3, worin

$\text{R}^2$  Methyl,

$\text{R}^3$  Azido,

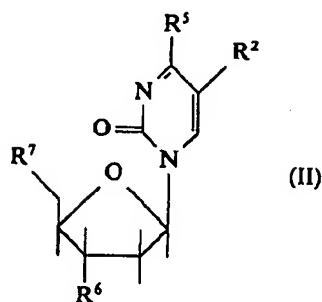
$\text{R}^4$  Hydroxyl oder Phosphat bedeuten.

6. Cytosinnucleosidanaloga gemäß einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Analoga in Form von Liposomen und/oder Immunoliposomenpräparaten vorliegen.

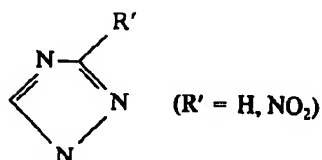
7. Mittel zur Behandlung von Krebserkrankungen und/oder Infektionskrankheiten, dadurch gekennzeichnet, daß es eine der Verbindungen gemäß einem der vorstehenden Ansprüche in einem üblichen pharmazeutisch verträglichen Träger oder Verdünnungsmittel, gegebenenfalls in Verbindung mit einem pharmazeutisch verträglichen Formulierungsmittel oder in Liposomen eingebaut, enthält.

8. Verfahren zur Herstellung von Cytosinnucleosidanaloga der Formel I gemäß Anspruch 1, dadurch

gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel II



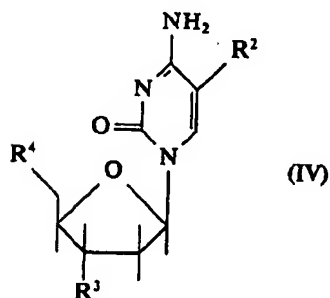
worin  
 $R^2$  die angegebene Bedeutung hat, und  
 $R^6, R^7$  die gleich oder verschieden sein können und  
 aus der Gruppe bestehend aus Wasserstoff, Fluor,  
 Chlor, Brom, Jod, Azido, Acetyl, Phosphat ausge-  
 wählt sind, und  
 $R^5$  ein Chloratom oder den Rest



bedeuten,  
 mit einem Amin der Formel III

HNR' (III),

worin  
 $R''$  einen C<sub>8</sub>—C<sub>24</sub> Alkylrest, der gegebenenfalls 0  
 bis 2 Doppelbindungen enthalten, linear oder ver-  
 zweigt sein kann, bedeutet, umgesetzt und in den so  
 erhaltenen Verbindungen gegebenenfalls die Ace-  
 tyl-Schutzgruppen gegen Wasserstoff austauscht.  
 9. Verfahren zur Herstellung von Cytosinnucleosi-  
 danaloga der Formel I gemäß Anspruch I, dadurch  
 gekennzeichnet, daß man Verbindungen der Formel IV



worin  
 $R^2, R^3, R^4$  die angegebene Bedeutung haben, mit  
 Carbonsäureanhydriden der Formel V,

$R''\text{—CO—O—CO—}R''$  (V)

worin

$R''$  die angegebene Bedeutung hat, umgesetzt.

10. Verwendung der Cytosinnucleosidanaloga ge-  
 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Behandlung  
 von Krebserkrankungen.

11. Verwendung der Cytosinnucleosidanaloga ge-  
 gemäß einem der Ansprüche 1 bis 7 zur Behandlung  
 von Infektionskrankheiten, insbesondere von virus-  
 bedingten Infektionen, vorzugsweise zur Behand-  
 lung von erworbener Immunschwäche (AIDS).

**Title:** New cytosine analogues with lipophilic protected amino gps. – for treatment of cancer and virus diseases e.g. AIDS, are more....

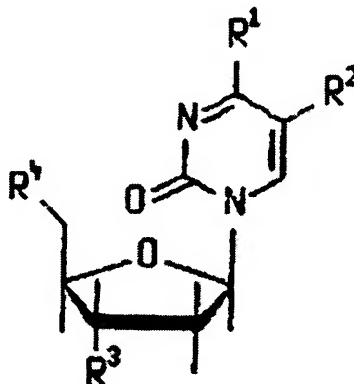
**Title:** Neue Cytosinnucleosidanaloga, Verfahren zu ihrer Herstellung und ihre Verwendung

**Abstract:**

Source: DE4224737A1 Cytosine nucleoside analogues of formula (I) are new; R<sup>1</sup> = acylated or alkylated amino, the acyl or alkyl gp. of which contains 8–24C and 0–2 double bonds and is opt. branched; R<sup>2</sup> = H, F, Cl, Br, I or opt. branched 1–24C alkyl which contains 0–2 double bonds; R<sup>3</sup>, R<sup>4</sup> = each H, F, Cl, Br, I, N<sub>3</sub>, OH or phosphate.

USE/ADVANTAGE – (I) can be used in the treatment of cancer and virus-dependent infections, e.g. AIDS. (I) can be used to treat malign diseases of blood forming cells, esp. acute leukaemia and chronic myeloid leukaemia. The N4–amino gp. is masked with a lipophilic protecting gp. so that (I) is more effectively protected against enzymatic deamination.

Compared to unprotected cytosine nucleoside analogues e.g. AZT, the dose of (I) can be greatly increased, without leading to an increase in the toxic side effects. (I) are prodrugs, and the slow conversion into the pharmacologically active substance enables therapy to be applied at intervals. (I) are lipophilic and can be dispersed in liposomes, thus widening the scope of methods of application. (I) have better cytostatic activity than 1–beta– D–arabino– furanosyl cytosine, less severe side effects and therapy can be applied at intervals.



I,

**International class** (IPC 8): C07H19/06 C07H19/10 (Advanced/Invention); C07H19/00 (Core/Invention)

**International class** (IPC 1–7): A61K31/70 C07H19/073

**European class:** C07H19/06E C07H19/10E

Family:	Publication number	Publication date	Application number	Application date
	DE4224737 A1	19940203	DE19924224737	19920727

**Priority:** DE19924224737 19920727

**Assignee(s):** (std): SCHOTT HERBERT PROF DR

**Inventor(s):** (std): GUERIN FREDERIQUE ODILE DR ; SCHOTT HERBERT PROF DR ; SCHWENDENER RETO ALBERT DR